



Generate Collection

L7: Entry 26 of 45

File: JPAB

Oct 19, 1992

PUB-NO: JP404293497A

DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 04293497 A

TITLE: METHOD AND SYSTEM FOR MEASURING NUMBER OF LIVE BACTERIA AND IDENTIFYING KIND OF BACTERIUM

PUBN-DATE: October 19, 1992

## INVENTOR-INFORMATION:

NAME

COUNTRY

HASEGAWA, HIDEYUKI

KUTSUNO, TAKAO

KASUGA, RIKI

SUZUKI, SHINPEI

IWATANI, FUKUO

ENDO, ISAO

NAGAMUNE, TERUYUKI

ASAMA, HAJIME

BENNO, YOSHIMI

## ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME

COUNTRY

HITACHI ELECTRON ENG CO LTD

N/A

RIKAGAKU KENKYUSHO

N/A

RES DEV CORP OF JAPAN

N/A

APPL-NO: JP03084739

APPL-DATE: March 25, 1991

US-CL-CURRENT: 435/34

INT-CL (IPC): C12Q 1/04; C12M 1/34

## ABSTRACT:

PURPOSE: To readily carry out measurement of number of live bacteria and identification of kind of bacteria such as clinical examination in a short time by culturing bacteria in a selective medium, irradiating the culture mixture with excitation light, measuring fluorescent intensity and comparing the intensity with a calibration curve previously made for a well-known kind of bacteria.

CONSTITUTION: A selective medium is partially injected to a microplate 1 by a partially injecting zone 2 of medium, a specimen containing cells to be measured is added to the microplate by a partially injecting zone 3 of cells, the specimen is diluted at plural stages by a device 4 for stepwise dilution and addition of fluorescent probe, a fluorescent probe is added to the plate, the plate is transported to a fluorescent light measuring device 5, fluorescent intensity before culture is measured, the measured fluorescent intensity is memorized in an outer memory of a data treating and controlling device 6, then the plate is cultured in an incubator for given time, after the culture, fluorescent intensity is remeasured, difference in fluorescent intensity before and after the culture is obtained, the difference is compared with the calibration line between the number of live bacteria and the fluorescent intensity corresponding to the number of bacteria previously made for well-known bacteria to carry out the measurement of the number of bacteria in the specimen and the identification of the kind of bacteria simultaneously in a short time.

## End of Result Set



Generate Collection

L10: Entry 1 of 1

File: DWPI

Oct 4, 1999

DERWENT-ACC-NO: 1992-394410  
DERWENT-WEEK: 199946  
COPYRIGHT 2001 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Measuring live count of specific material strains - by culturing microbe in medium, measuring intensity of fluorescent light formed from cultured prod. and estimating bacterial count from calibration curve

## PATENT-ASSIGNEE:

## ASSIGNEE

## CODE

HITACHI DENSHI ENG CO LTD

HISB

RES DEV CORP JAPAN CO LTD

SHKJ

RIKAGAKU KENKYUSHO CO LTD

RIKA

PRIORITY-DATA: 1991JP-0084739 (March 25, 1991)

## PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE	PAGES	MAIN-IPC
JP 2957301 B2	October 4, 1999	N/A	010	C12Q001/04
<u>JP 04293497 A</u>	October 19, 1992	N/A	010	C12Q001/04

## APPLICATION-DATA:

PUB-NO	APPL-DATE	APPL-NO	DESCRIPTOR
JP 2957301B2	March 25, 1991	1991JP-0084739	N/A
JP 2957301B2		JP 4293497	Previous Publ.
JP 04293497A	March 25, 1991	1991JP-0084739	N/A

INT-CL (IPC): C12M 1/34; C12Q 1/04

ABSTRACTED-PUB-NO: JP 04293497A

## BASIC-ABSTRACT:

Method comprises: (a) culturing microbe in a selective culture medium; (b) measuring intensity of fluorescent light formed from the cultured product; and (c) estimating the bacterial count using the evaluating curve showing the relation between the intensity of fluorescent light and live bacterial count.

The selective culture medium is prepd. for Escherichia coli, Salmonella and Staphylococcus aureus and the invented method can be applied to only these microbes. The identifying method is characterized by using specific selective culture medium and one can identify the microbe from the fact that the microbe can grow in which culture medium.

USE/ADVANTAGE - Three kinds of bacteria can be identified and rapidly and its live bacterial count can be also measured within 8 hours.

CHOSEN-DRAWING: Dwg.0/10

TITLE-TERMS: MEASURE LIVE COUNT SPECIFIC MATERIAL STRAIN CULTURE MICROBE MEDIUM MEASURE INTENSITY FLUORESCENT LIGHT FORMING CULTURE PRODUCT ESTIMATE BACTERIA COUNT CALIBRATE CURVE

DERWENT-CLASS: B04 D16

CPI-CODES: B04-B02B1; B11-C07B3; B12-K04; D05-H04;

CHEMICAL-CODES:

Chemical Indexing M1 \*01\*

Fragmentation Code

M423 M750 M903 N102 Q233 Q613 V500 V540

Registry Numbers

92407

Chemical Indexing M6 \*02\*

Fragmentation Code

M903 Q233 Q613 R514 R515 R521 R635

Registry Numbers

92407

SECONDARY-ACC-NO:

CPI Secondary Accession Numbers: C1992-174955

ABS: Invalid display element.

L10: Entry 1 of 1

File: DWPI

Oct 4, 1999

DERWENT-ACC-NO: 1992-394410

DERWENT-WEEK: 199946

COPYRIGHT 2001 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Measuring live count of specific material strains - by culturing microbe in medium, measuring intensity of fluorescent light formed from cultured prod. and estimating bacterial count from calibration curve

DID:

JP 04293497 A

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平4-293497

(43)公開日 平成4年(1992)10月19日

(51)Int.Cl.<sup>5</sup>

C 1 2 Q 1/04

C 1 2 M 1/34

識別記号

庁内整理番号

6807-4B

B 2104-4B

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数5(全10頁)

(21)出願番号 特願平3-84739

(22)出願日 平成3年(1991)3月25日

(71)出願人 000233480

日立電子エンジニアリング株式会社  
東京都千代田区大手町2丁目6番2号

(71)出願人 000006792

理化学研究所  
埼玉県和光市広沢2番1号

(71)出願人 390014535

新技術事業団  
東京都千代田区永田町2丁目5番2号

(72)発明者 長谷川 秀行

東京都千代田区大手町二丁目6番2号 日  
立電子エンジニアリング株式会社内

(74)代理人 弁理士 梶山 信是 (外1名)

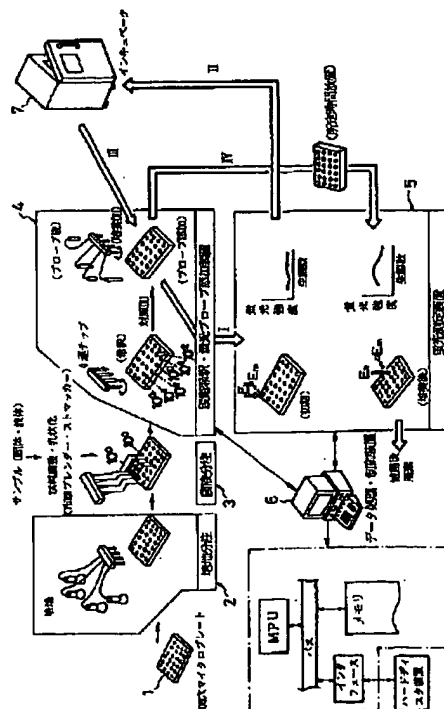
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 生菌数測定・菌種同定方法およびシステム

(57)【要約】

【目的】 短時間で菌種を同定すると共に、推定生菌数を求めることのできる方法およびその方法の実施に使用される装置を提供する。

【構成】 選択培地で微生物を培養し、該培養物に励起光を照射し、該培養物からの蛍光の強度を測定し、既知の微生物種について予め作成された生菌数と該菌数に対応する蛍光強度との検量線に前記測定値を当てはめることにより、菌種同定と生菌数の推定を行う。本発明の方法は大腸菌、サルモネラ菌および黄色ブドウ球菌に特化して用いられる。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 選択培地で微生物を培養し、該培養物に励起光を照射し、該培養物からの蛍光の強度を測定し、既知の微生物種について予め作成された生菌数と該菌数に対応する蛍光強度との検量線に前記測定値を当てはめることからなる生菌数の測定および該菌の同定方法。

【請求項2】 微生物は大腸菌、サルモネラ菌および黄色ブドウ球菌である請求項1の方法。

【請求項3】 被測定微生物を含む検体を複数の段階に希釈し、蛍光プローブを添加する装置と、培養前および培養後の検体に励起光を照射し、該検体から発せられる蛍光の強度を測定する蛍光測定装置と、既知の微生物種について予め作成された生菌数と該菌数に対応する蛍光強度との検量線がデータベースとして記憶された外部記憶装置と、前記蛍光測定装置による検出値に基づき外部記憶装置のデータベースを検索、参照しデータ処理を行うと共に、希釈・プローブ添加装置および蛍光測定装置を制御する装置とからなる生菌数測定・菌種同定システム。

【請求項4】 蛍光測定装置は、少なくとも、励起光を発生する発光手段と；励起光を被測定物に照射する手段と；被測定物から発生される蛍光を受光する手段と；蛍光と共に進入してくる迷光励起光をカットするバンドパスフィルタと；前記バンドパスフィルタを通過した蛍光を捕捉する光電子増倍管とを有する請求項1のシステム。

【請求項5】 蛍光受光手段は光ファイバーである請求項4のシステム。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は生菌数の測定ならびに菌種同定方法および該方法を実施するのに使用される装置に関する。更に詳細には、本発明は、特定の選択培地を用いて検体中の、大腸菌、サルモネラ菌および黄色ブドウ球菌からなる群から選択される特定の菌のみを増殖させ、該菌の培養物から発せられる蛍光を捕捉することからなる生菌数の測定および菌種の同定方法と装置に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 従来、微生物種の同定は、パーギー(Bergey)のマニュアルなどに従い、培養物の形態学および生理学的性質を調べることにより行われている。一方、生菌数はサンプル(検体)を $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、・・・、 $10^{-8}$ 倍に等倍希釈し、この希釈液の一定量を寒天平板培地上に塗抹接種し、一定時間(例えば、24～48時間)培養した後、この寒天平板上に出現したコロニー数に希釈倍率を乗じることにより求められていた。

【0003】 しかし、このような全くの手作業による微生物検査法では、2～5日間の検査期間と、かなりの熟練技術とを必要とし、また、技術者あるいは検査員によ

る測定差が生じることも知られている。更に、大量の培地およびシャーレの使用および熟練技術者の高い人件費のため、検査に要する費用も非常に高いものになっている。

【0004】 微生物種の同定、生菌数の測定などの微生物検査は、臨床検査、食品検査、医薬品検査などの部門で必須であり、迅速化、省人化、自動化に対するニーズは高い。特に、臨床検査部門では各種の自動化機器の開発が行われている。例えば、50rpmで回転している寒天平板培地に、サンプル液を中心から外側に向かって塗抹するプレート、塗抹された寒天培地を培養し、コロニーの形成された平板培地をHe-Neレーザでコロニー計数するスパイラルシステム社のスパイラルシステム、各種の基質が入ったカートリッジを用い、比色法で微生物種の同定、比濁吸光法による薬剤感受性試験を自動で行えるAuto Microbic System, MS-II, Advantageなどのシステム、カートリッジの代わりにマイクロプレートを用いたダイナテック社のMIC-2000システムなどが、アメリカを中心に開発されている。

【0005】 しかし、これらの機器の大部分は尿路感染などの微生物検査に用いられているに過ぎず、食品検査のようなサンプルが混濁物であることが多い場合には測定が不可能であり、また、十分な精度が得られなかった。更に、何れの方法も、24～48時間の培養時間を必要とするので、迅速測定が困難である。このため、現場の切実なニーズに十分応えられる段階には達していない。また、これらの自動機器、測定方法に関する研究は、臨床医学分野、医用工学分野などで盛んに行われているが、実用化されているものは極めて少ない。

## 【0006】

【発明が解決しようとする課題】 従って、本発明の目的は、広範な分野で使用でき、高精度で、しかも、低コストで、更に検査時間が数時間程度で済む、生菌数測定・菌種同定方法および該方法の実施に使用する装置を提供することである。

## 【0007】

【課題を解決するための手段】 前記目的を達成するために、本発明では、選択培地で微生物を培養し、該培養物に励起光を照射し、該培養物からの蛍光の強度を測定し、既知の微生物種について予め作成された生菌数と該菌数に対応する蛍光強度との検量線に前記測定値を当てはめることからなる生菌数の測定および該菌の同定方法を提供する。本発明の対象となる微生物は、大腸菌、サルモネラ菌および黄色ブドウ球菌に限られる。また、被測定微生物を含む検体を複数の段階に希釈し、蛍光プローブを添加する装置と、培養前および培養後の検体に励起光を照射し、該検体から発せられる蛍光の強度を測定する蛍光測定装置と、既知の微生物種について予め作成された生菌数と該菌数に対応する蛍光強度との検量線がデータベースとして記憶された外部記憶装置と、前記蛍

光測定装置による検出値に基づき外部記憶装置のデータベースを検索、参照しデータ処理を行うと共に、希釈・プローブ添加装置および蛍光測定装置を制御する装置とからなる生菌数測定・菌種同定システムも提供する。蛍光測定装置は、少なくとも、励起光を発生する発光手段と；励起光を被測定物に照射する手段と；被測定物から発生される蛍光を受光する手段と；蛍光と共に進入してくる迷光励起光をカットするバンドパスフィルタと；前記バンドパスフィルタを通過した蛍光を捕捉する光電子増倍管とを有する。蛍光を受光する手段は例えば、光ファイバである。

#### 【0008】

【作用】前記のように、本発明の方法では大腸菌、サルモネラ菌および黄色ブドウ球菌に特化して、その生菌数および菌種の同定を行う。下記で詳細に説明する特定の選択培地を使用し、前記菌類を含有すると思われる検体を培養すると、各菌により生育するものと、しないものとが現れる。従って、その培地の種類により生育した微生物種、すなわち、検体中に存在している微生物種を同定することができる。

\*20

$K_2HPO_4$  7 g/l,  $KH_2PO_4$  3 g/l,  
 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.1 g/l,  $(NH_4)_2SO_4$  0.1 g/l,  
 トリプチカーゼ 1 g/l, グルコース 2 g/l,

この培地をA培地と呼ぶ。この培地では大腸菌とサルモネラ菌だけが選択的に生育する。従って、この培地に検体を接種し、培養して、コロニーが出現すれば、それは※

$K_2HPO_4$  7 g/l,  $KH_2PO_4$  3 g/l,  
 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.1 g/l,  $(NH_4)_2SO_4$  0.1 g/l,  
 トリプチカーゼ 1 g/l, グルコース 2 g/l,  
 ノボピオシン 適量

この培地をB培地と呼ぶ。この培地は前記のA培地にノボピオシンを添加配合したものである。ノボピオシンはマクロライド系抗生物質であり、例えば、米国のアップジョン社から“アルバマイシン”の登録商標名で市販されている。A培地自体は大腸菌とサルモネラ菌用の選択培地であるが、これにノボピオシンが加わることにより、大腸菌は生育せず、サルモネラ菌だけが選択的に生育する。従って、この培地に検体を接種し、培養して、★

トリプチカーゼ 2.5 g/l, フィトン 0.5 g/l,  
 NaCl 5 g/l, Tween 80 1.0 g/l,  
 アズレオナム 0.25 μg/ml

この培地をC培地と呼ぶ。アズレオナムは米国スクイブ社で開発された“モノバクタム”系抗生物質であり、大腸菌およびサルモネラ菌に対して特異的な活性を示すが、黄色ブドウ球菌に対しては殆ど活性を持たない。従って、この培地に検体を接種し、培養して、コロニーが出現すれば、それは黄色ブドウ球菌によるものと推定できる。

【0014】通常市販されている選択培地の蛍光強度は極めて強いので、本発明の方法により培養物の蛍光強度

\*【0009】微生物種と培地との組み合わせは予め既知なので、この培地で該当微生物を標準的な手法により培養し、公知の確立された方法により各培養時間毎の生菌数を計数し、同時に、該菌数に対応する蛍光強度を測定し、検量線を作成し、データベースとして保存する。未知検体を選択培地で培養し、生育するものがあれば、その培地の種類から菌種は容易に同定できる。それと共に、所定の培養時間時点における蛍光強度を該当する培地/微生物のデータベースと照合すれば、その微生物の生菌数が即座に求められる。

【0010】蛍光受光手段として光ファイバーを使用すると、従来のダイクロイックミラーに比べて、微弱な蛍光もキャッチすることができ、測定感度が増大する。

#### 【0011】

【実施例】以下、実施例により本発明を更に詳細に説明する。本発明の方法の特徴はその選択培地の使用にある。前記のように、本発明の方法は大腸菌、サルモネラ菌および黄色ブドウ球菌に特化して用いられるが、大腸菌およびサルモネラ菌だけを選択的に生育させることができる培地は例えば、下記の組成を有する。

※大腸菌およびサルモネラ菌によるものと推定できる。

【0012】また、サルモネラ菌だけを選択的に生育させることのできる培地は例えば、下記の組成を有する。

★コロニーが出現すれば、それはサルモネラ菌によるものと推定できる。ノボピオシンの添加量は一般的に、5 μg/ml～30 μg/ml、好ましくは、10 μg/ml～20 μg/ml、最も好ましくは、15 μg/mlである。

【0013】黄色ブドウ球菌だけを選択的に生育させることのできる培地は例えば、下記の組成を有する。

変化を捉えることは極めて困難であるか、または不可能である。培地成分中、肉エキス、ペプトン、酵母エキス等は蛍光強度が極めて強い。しかし、これらの成分は一般的に、微生物の生長に欠くことのできない栄養成分である。本発明者らの研究によれば、大腸菌およびサルモネラ菌の栄養要求度は高くないので、これらを除いても生育することが確認された。従って、前記の大腸菌およびサルモネラ菌用のA培地は実質的に無蛍光培地であると言うことができる。

【0015】一方、黄色ブドウ球菌の場合、培養物だけからの蛍光では十分な測定ができないので、培養物にA0-10ドデシルプロマイドと呼ばれる蛍光標識を添加し、蛍光強度を測定する。添加されたA0-10ドデシルプロマイドは黄色ブドウ球菌と特異的に結合し、菌数に応じた蛍光強度を示す。すなわち、A0-10ドデシルプロマイド自体は蛍光を発せず、黄色ブドウ球菌と結合した場合にだけ蛍光を発するので本発明の方法における蛍光標識として使用できる。

【0016】次に、図面を参照しながら本発明を更に詳細に説明する。図1は本発明の方法を実施するのに使用されるマイクロプレート1の一例の模式的平面図である。プレート自体の材質は特に限定されないが、励起光の散乱が極力少なく、蛍光の発生および受光を阻害しないような材質ならば全て使用できる。例えば、透明ポリカーボネートなどが使用できる。しかし、これに限定されないことは当然である。図示されているプレートは96穴のものである。穴の使用態様は特に限定されない。一例として、図示されているように、12列の内、第1列目と第7列目に菌液または検体を入れ、第2列目から第6列目まで、および第8列目から第12列目までを段階希釈用として使用する。この例では、第1列目から第6列目までを対照用（例えば、培養前の蛍光のバックグラウンド値を測定するためのもの）として使用し、第7列目以降を培養後の蛍光測定に使用する。A行からH行までは同一の菌あるいは培地をいれることもできるし、A～D行とE～H行に2分割し前記の各培地を入れることもできる。このような穴の具体的使用態様は当業者には周知であり、これ以上の説明は特に必要ないであろう。

【0017】次に、図2を参照しながら本発明の方法を実施する際の一連の手順を説明する。まず始めに、図1に示されたようなマイクロプレート1を準備し、培地分注ゾーン2で、プレートの所定の穴に所定の選択培地を分注する。分注は手作業でも、自動機械でもいづれによっても実施できることは当業者に周知である。次に、菌液分注ゾーン3で、検体（固体または液体）または菌液を市販のブレンダーまたはストマッカーなどにより調整／乳状化し、前記のようにプレートの第1列目と第7列目に分注する。この分注も手作業あるいは自動機械により行うことができる。ただし、特に限定されるわけではないが、培地分注と菌液分注は本発明の自動生菌数測定・菌種同定システムには組み込まれていない。従って、本発明のシステムを使用する者が前処理として行うべきものである。

【0018】その後、このプレート1は本発明のシステムの段階希釈・蛍光プローブ添加装置4にローディングされる。ここで、第1列目と第7列目の菌液を例えば、10μlをそれぞれ自動的に採取し、2列目と8列目の穴にそれぞれ注入する。次に、この2列目と8列目の穴

からそれぞれ10μl量を自動的に採取し、3列目と9列目の穴にそれぞれ注入する。以後、これを6列目と12列目まで順に繰り返す。そうすると、 $10^0$ 、 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ の7段階の希釈列が得られる。本発明者らが実験したところでは、 $10^{-6}$ 以上の希釈はコロニーの発生が見られず、無意味であることが確認された。

【0019】段階希釈が完了したら、プレートの対照側の全ての穴にのみA0-10ドデシルプロマイドプローブ液を分注する。前記のように、A0-10ドデシルプロマイドプローブは黄色ブドウ球菌に対してのみ特異的であるが、バックグラウンド値の正確を期するために、大腸菌およびサルモネラ菌の場合にも使用することが好ましい。

【0020】プレートの対照側の穴にプローブ液を分注したら、このプレートを蛍光測定装置5に移送する。ここで、培養前の蛍光強度を測定し、バックグラウンド値として、データ処理・制御装置6の外部記憶装置に記憶させる。その後、このプレートをインキュベータ7に移し、所定時間にわたって所定条件の下で培養する。培養後、プレートを再び蛍光プローブ添加装置に戻し、ここで、プレートの培養側の全ての穴にA0-10ドデシルプロマイドプローブ液を分注する。菌とプローブとの結合反応を確実に行わせるために、プローブ分注後、数分間～10分間程度プレートを放置する。その後、蛍光測定装置でプレートの培養側の蛍光強度を測定し、測定結果をデータ処理・制御装置6の外部記憶装置に伝達する。ここで培養後の蛍光強度から培養前のバックグラウンド値を引き算すると、真の蛍光強度が求められる。この引き算の結果を外部記憶装置内のデータベースと照合することにより菌種および生菌数が決定される。

【0021】前記の処理手順を図3にフローチャートとして示す。培地分注と菌液分注の前処理10を経て、段階希釈・プローブ分注11に入る。次いで、初期蛍光強度測定12を行う。測定値はライン13でデータ処理・制御装置14に伝達される。初期蛍光強度測定後、培養14を行う。培養後、11に戻り、再びプローブ分注を行う。その後、培養後蛍光強度測定15を行う。測定値はライン16でデータ処理・制御装置14に伝達される。データ処理・制御装置14は外部記憶装置としてデータベース17を有する。伝達された測定蛍光値をデータベースと照合し、菌数・菌種を決定し18で出力する。

【0022】図4に本発明の生菌数測定・菌種同定システム20の模式的構成を示す。本発明のシステムは前記のように、基本的には段階希釈・蛍光プローブ添加装置4と蛍光測定装置5とデータ処理・制御装置6から構成されている。特に排除するわけではないが、インキュベータ7は一般的に、本発明のシステム20には含まれない。すなわち、本発明のシステム20を使用する者が

7

自ら準備するべきものとしている。図示された態様では段階希釈・蛍光プローブ添加装置4と蛍光測定装置5とがあたかも別個の分離した装置のようにになっているが、両者を結合して単一のシステムとして構成できることは当業者に自明である。図中、白抜太矢線I～IVはプレートの搬送方向を示すが、IおよびIVについてはシステム内で自動ハンドリング機構（図示されていない）により行うことができる。IIおよびIIIは手作業になる。

【0023】段階希釈・蛍光プローブ添加装置4の具体的な装置構成自体は特に限定されない。段階希釈・蛍光プローブ添加の所期の目的を達成できるような装置構成であればよい。一例として、図示されているように、X-Y-Z-Z'軸移動機構22を使用し、Z'軸に4連チップ分注機構24を配設し、プローブ液槽26を設けることができる。また、図示されていないが、チップは使い捨てなので、チップ供給・廃棄機構も配設することができる。段階希釈・蛍光プローブ添加装置は密閉ボックス内に収容し、UV（紫外線）殺菌ランプ28によりボックス内を無菌状態に維持することが好ましい。

【0024】蛍光測定装置5の具体的な装置構成自体も特に限定されない。しかし、本発明のシステム20では、下記の図5に示すような光学系を有する測定装置を使用することが好ましい。図示された蛍光測定装置5は例えば、光学系ユニット30とプレートを移動させるためのX-Yテーブル32を有する。この図示された光学系ユニット30の特徴は、下記で詳細に説明するが、ホルダ34に保持された光ファイバー36で蛍光を受光することである。蛍光測定装置も密閉ボックス内に収容し、UV（紫外線）殺菌ランプ28によりボックス内を無菌状態に維持することが好ましい。また、前記のように、段階希釈・蛍光プローブ添加装置4と蛍光測定装置5を一つの密閉ボックス内に収容することもできる。

【0025】本発明のシステム20では、段階希釈・蛍光プローブ添加装置4と蛍光測定装置5はデータ処理・制御装置6と結ばれている。必要に応じて、拡張スロットボックス40を介して結ぶこともできる。装置4と装置5が、このデータ処理・制御装置6内に予めプログラムされた手順に従って動作するように、データ処理・制御装置6は装置4と装置5のコントローラの機能も果たしている。データ処理・制御装置6は本体内のCPUの他に、データベースを格納するHDDのような外部記憶装置42を有することもできる。更に、制御内容を表示したり、測定結果を出力するためのCRT44およびプリンタ46を備えることができる。

【0026】図5に本発明の生菌数測定・菌種同定システムの蛍光測定装置における光学系の概念構成図を示す。光源として、例えば、キセノンランプ50を使用し、背後に補助ミラー52を配置し、前方にコンデンサレンズ54を配置すると共に、該レンズの前方に熱線吸収フィルタ56を配置することにより光源系を構成して

8

いる。コンデンサレンズ54で平行にされた光線は特定の波長の励起光のみを取り出すために励起光バンドパスフィルタ58を通される。このフィルタはモータにより回転され、図示されているように0～3の4種類の波長の励起光が得られるようになっている。しかし、このフィルタ数に限定されるわけではない。励起光の波長自体は本発明の必須要件ではないが、一般的な指標として、大腸菌およびサルモネラ菌の場合、365または470nmの波長の励起光を使用することが好ましい。一方、黄色ブドウ球菌の場合は490nmの波長の励起光を使用することが好ましい。バンドパスフィルタ58を通過した励起光はリレーレンズ62および可変絞り64を通過する。平行化励起光は可変絞り64で絞られ、反射鏡66で90°屈折される。屈折励起光は結像用レンズ68で焦点合わせされ、マイクロプレートのウエル（穴）70内の検体に照射される。別法として、励起光バンドパスフィルタ58を出た励起光は光ファイバ（図示されていない）により誘導し、検体に照射することもできる。光ファイバーを使用すれば、リレーレンズ、可変絞り、反射鏡および結像用レンズが不要になり、励起光のエネルギー減衰を抑制することができる。

【0027】検体から発生した蛍光は光ファイバーで受光される。蛍光受光用光ファイバーの本数は1本以上（例えば、6本）であればよい。光ファイバーは検体の周囲を円形に取り囲むように配置することが好ましい。このため、図4で簡単に示したようなホルダ34で保持することが好ましい。垂直入射励起光に対する光ファイバーの保持角度は特に限定されない。蛍光を受光するのに最大の効率を達成できるような角度であればよい。このような角度は当業者が容易に決定することができる。一般的には、45°が好ましい。

【0028】光ファイバー72で受光された蛍光は更に蛍光側バンドパスフィルタ74および励起光側バンドパスフィルタ76に誘導される。フィルタ74および76はフィルタ58と同番号のフィルタを使用しなければならない。フィルタ74およびフィルタ76も、図示されていないが、モータ60でフィルタ58と同時に駆動制御される。蛍光側バンドパスフィルタ74は大腸菌およびサルモネラ菌の場合には520および530nmの波長の蛍光を通過させるものを使用し、黄色ブドウ球菌の場合には、535および540nmの蛍光を通過させるものを使用することが好ましい。フィルタ76は迷光励起光が存在していた場合に、蛍光強度の外乱要因にならないようにデータから除去するために使用できる。しかし、このフィルタ76は必ずしも使用する必要はない。各フィルタの直後には光電子増倍管78および80が配置されている。光電子増倍管からの電気信号は増幅回路82および84を経て、図2および図4に示されるようなデータ処理・制御装置に伝達される。

【0029】次に、データベースの作成法について説明



9

する。生菌数に関するデータは従来の寒天平板法により得られる。例えば、希釈倍率  $10^{-6}$  倍の検体から 0.1 ml 採取し、これを寒天平板に接種し  $37^{\circ}\text{C}$  で大気中雰囲気です定時間培養する。また、希釈倍率  $10^{-7}$  倍の検体から 0.1 ml 採取し、これを寒天平板に接種し同様に  $37^{\circ}\text{C}$  で大気中雰囲気です定時間培養する。培養後、寒天平板上に出現したコロニー数を計数する。例えば、 $10^{-6}$  の検体の場合、コロニーが 100 個出現し、 $10^{-7}$  の検体の場合、コロニーが 10 個出現した場合、 $10^{-6}$  の検体における菌数は、 $100 \times 10^6 \times 10 = 10^9$  個/ml になり、 $10^{-7}$  の検体では、 $10 \times 10^7 \times 10 = 10^9$  個/ml になる。この結果から、検体中の生菌数は  $10^9$  と推定される。この測定を、例えば、培養開始から 3 時間、4.5 時間、6 時間、7.5 時間目にそれぞれ行うと経時的な菌数の変化を示す特性曲線が得られる。

【0030】また、これと同時に、本発明の蛍光測定システムを使用し、培養開始から 3 時間、4.5 時間、6 時間、7.5 時間目における蛍光強度を測定する。このデータから特性曲線を作成すると、時間の経過により蛍光強度が増大する様子が確認できる。従って、前記の各培養時間における生菌数のデータと各培養時間における蛍光強度のデータを合わせると、生菌数に対する蛍光強度の検量線が作成できる。これをデータベースとして蓄積保存する。従って、未知検体の菌種が同定されれば、その菌種の生菌数/蛍光強度検量線データベースに測定蛍光強度を当てはめれば生菌数が得られる。

【0031】本発明の方法およびシステムで使用するデータベースの作成に関する基本的概念は前記の通りである。従って、本発明の方法およびシステムの信頼性は取りも直さず、データベースの信頼性に依存する。このため、出来るだけ多数の培養実験を繰り返し、得られた結果を統計処理し、バラツキの最小化を図り、可能な限り普遍的なデータベースを構築することが好ましい。例えば、大腸菌には多数の種類の菌および変異株などが存在するので、培養条件および蛍光測定条件を同一にしても、各菌または株により、同じ生菌数でも蛍光強度に若干の変化が生じる。本発明の方法では大腸菌群の中の特定の菌株までは同定できないので、検体中に様々な大腸菌株が混在していたとしても、一般的総称的な大腸菌の生菌数として推定される。サルモネラ菌および黄色ブドウ球菌についても同様である。

【0032】前記のような菌株の相違などのようなファクタに起因して、ノイズが初期菌濃度の予測値に大きく影響することがあるので、確固としたデータベースの確立と共に、得られた蛍光強度の実測値をファジィ理論により処理することもできる。具体的な変数値（蛍光強度測定値など）と言語によって表現されるファジィ変数（蛍光強度が「大」など）を関係づける関数をメンバーシップ関数と呼ぶ。また、「蛍光強度変化量が大きけれ

10

ば、初期菌濃度は非常に大きい」などといった、事象の関係をルールベースと呼ぶ。ファジィ理論によって、蛍光強度の変化量から初期菌濃度を推定するには、各同定菌種・希釈濃度ごとに蛍光強度の変化量から初期菌濃度を推定するルールのデータベース（すなわち、ルールベース）と各ファジィ変数のメンバーシップ関数を作成し、データ処理装置内に記憶させる。この手法によれば、蛍光強度の実測値に誤差が含まれていても、ファジィの特徴である「あいまい性」の処理によって、期待値からのズレをある程度平滑化・補正し、ノイズをキャンセルして、初期菌濃度を信頼性高く実測することができる。このルールベースおよびメンバーシップ関数、実験データの蓄積に伴い、順次修正・チューニングを行うことによって更に測定精度を高めることが可能になる。また、学習機能を追加することによって、自動的にこれらのチューニングを行い、機能を向上させることができる。

【0033】前記のような基本的概念に基づいて作成された検量線の一例を図 6～図 8 に示す。図 6 は大腸菌（JCM1646 株）の培養における蛍光強度と生菌数の関係を示すグラフである。白六角スポットは培養時間に対する生菌数の経時変化を示す特性曲線である。一方、●は、培養時間に対する蛍光強度の経時変化を示す特性曲線である。図 7 はサルモネラ菌（S206 株）の培養における蛍光強度と生菌数の関係を示すグラフである。白六角スポットは培養時間に対する生菌数の経時変化を示す特性曲線である。一方、●は、培養時間に対する蛍光強度の経時変化を示す特性曲線である。また、図 8 は黄色ブドウ球菌（JCM2413 株）の培養における蛍光強度と生菌数の関係を示すグラフである。白六角スポットは培養時間に対する生菌数の経時変化を示す特性曲線である。一方、●は、培養時間に対する蛍光強度の経時変化を示す特性曲線である。

#### 【0034】

【発明の効果】以上説明したように、本発明の方法およびシステムによれば、約 8 時間程度の短時間内に大腸菌、サルモネラ菌または黄色ブドウ球菌の菌種を同定し、あわせて、これらの菌数を測定することができる。

#### 【図面の簡単な説明】

【図 1】図 1 は本発明の方法およびシステムの実施に使用されるマイクロプレートの一例の模式的平面図である。

【図 2】図 2 は本発明の方法の処理の進行を示す模式的概念図である。

【図 3】図 3 は本発明の方法の処理手順の流れを示すフローチャートである。

【図 4】図 4 は本発明のシステムの模式的構成図である。

【図 5】図 5 は本発明のシステムで使用される蛍光測定のための光学系の模式的構成図である。

【図6】図6は大腸菌の培養における蛍光強度と生菌数の関係を示す特性曲線である。

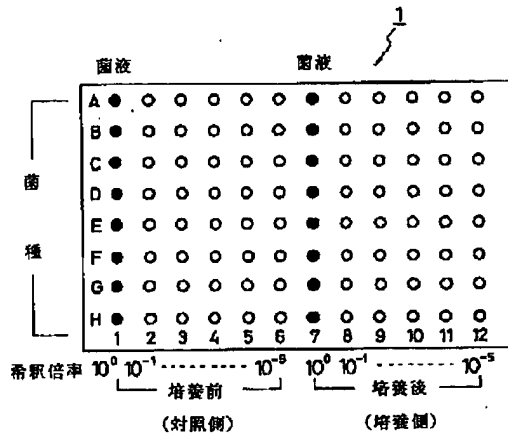
【図7】図7はサルモネラ菌の培養における蛍光強度と生菌数の関係を示す特性曲線である。

【図8】図8は黄色ブドウ球菌の培養における蛍光強度と生菌数の関係を示す特性曲線である。

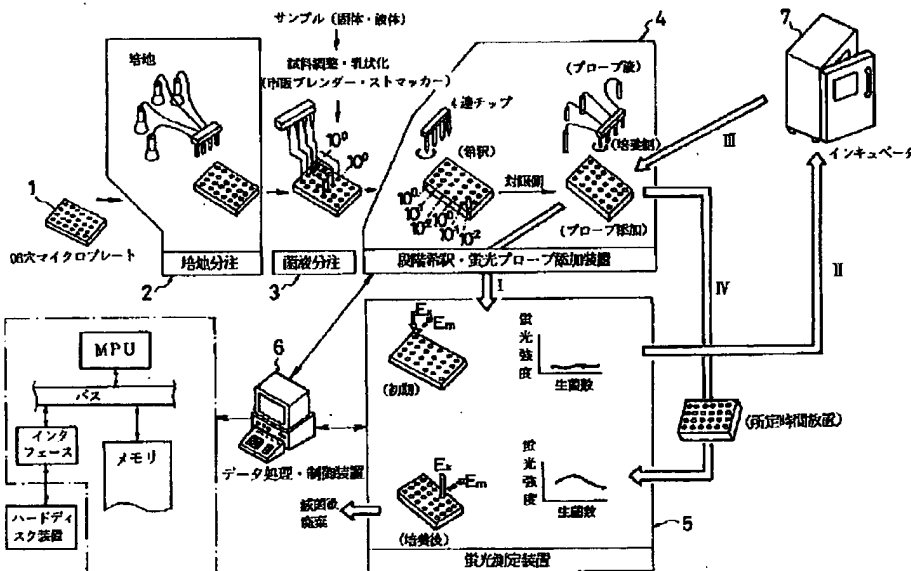
【符号の説明】

- 1 マイクロプレート
- 2 培地分注ゾーン
- 3 菌液分注ゾーン
- 6 データ処理・制御装置
- 7 インキュベータ

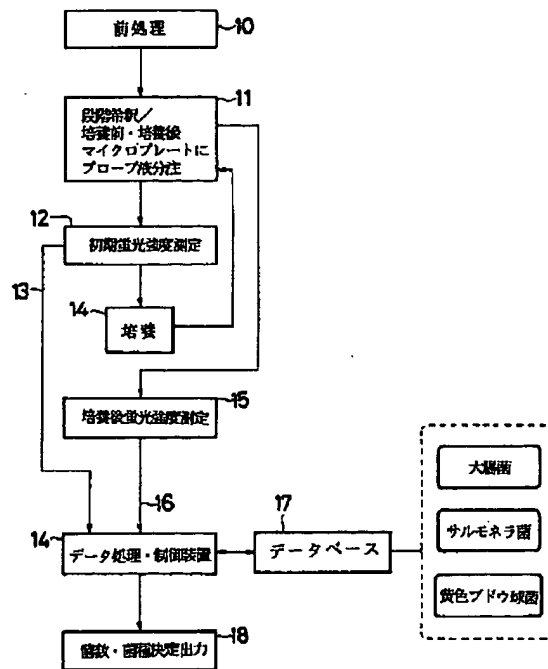
【図1】



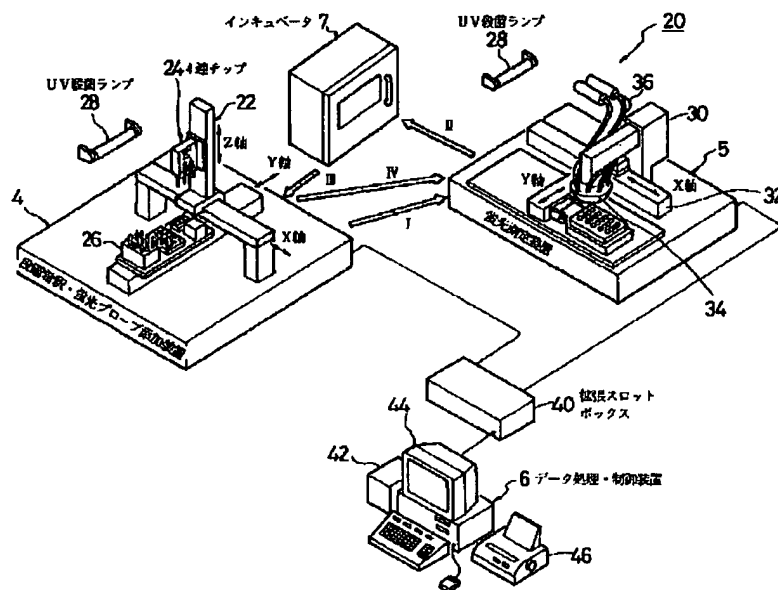
【図2】



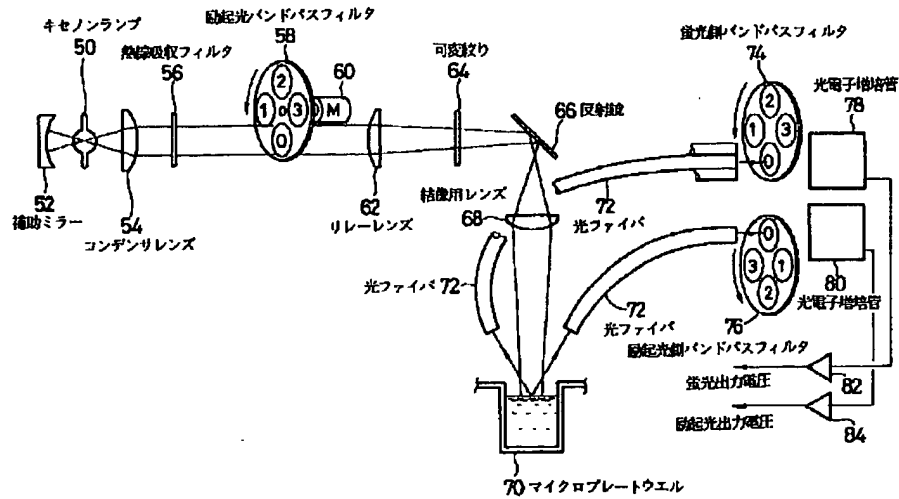
【図3】



【図4】



【図5】



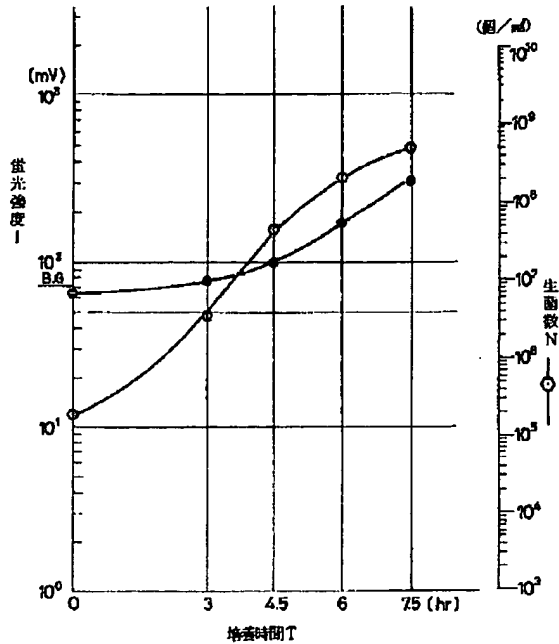
【図6】

大腸菌 (JCM1849) の培養における  
蛍光強度 I と生菌数 N の関係  
使用培地: A 培地

(培養初期生菌濃度)  $2.2 \times 10^4$  個/ml

NDフィルタ: 無  
スポット径:  $\phi 2$   
ファイバ角度:  $45^\circ$   
PMT: 800 V

フィルタ 2: ● Ex 470, Em 530+Y 52



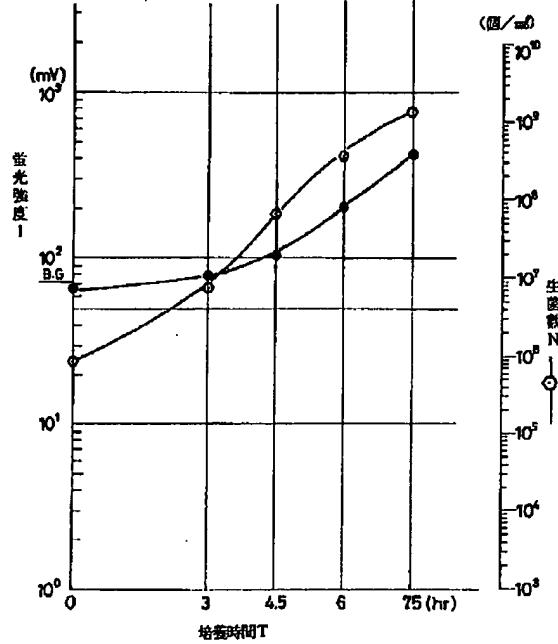
【図7】

サルモネラ菌 (S206) の培養における  
蛍光強度 I と生菌数 N の関係  
使用培地: B 培地

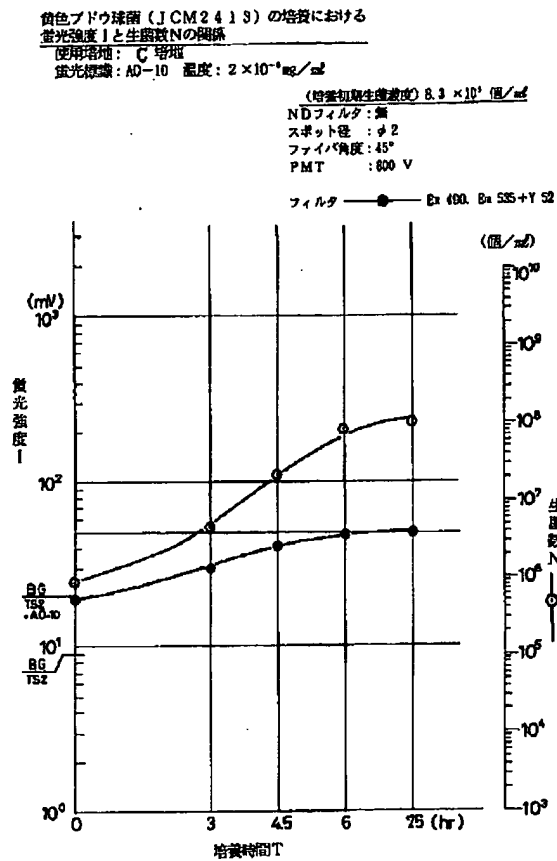
(培養初期生菌濃度)  $9.0 \times 10^4$  個/ml

NDフィルタ: 無  
スポット径:  $\phi 2$   
ファイバ角度:  $45^\circ$   
PMT: 800 V

フィルタ 2: ● Ex 470, Em 530+Y 52



【図8】



フロントページの続き

(72)発明者 久津野 孝夫

東京都千代田区大手町二丁目6番2号 日  
 立電子エンジニアリング株式会社内

(72)発明者 春日 里佳

東京都千代田区大手町二丁目6番2号 日  
 立電子エンジニアリング株式会社内

(72)発明者 鈴木 新平

東京都千代田区大手町二丁目6番2号 日  
 立電子エンジニアリング株式会社内

(72)発明者 岩谷 福雄

東京都千代田区大手町二丁目6番2号 日  
 立電子エンジニアリング株式会社内

(72)発明者 遠藤 勲

埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所  
 内

(72)発明者 長棟 輝行

埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所  
 内

(72)発明者 浅間 一

埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所  
 内

(72)発明者 辨野 義己

埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所  
 内